Münster i/W. 1934. 46 Phil. Diss.

Chemie

Beiträge zur Kenntnis der Sterine.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

der Philosophischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster

vorgelegt von

WERNER FRICKENSCHMIDT

aus Poelloe-Tello (Sumatra).

19 NOLTE 34

DISSERTATIONS-VERLAG G. H. NOLTE DÜSSELDORF

Dekan: Professor Dr. R. Schmidt

Referent: Professor Dr. A. Bömer

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 1931

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Die Sterine sind seit ihrer Entdeckung als regelmäßige Begleiter der Tier- und Pflanzenfette für die Fettchemie von großer Wichtigkeit und Bedeutung geworden. Nachdem E. Salkowski[1]) zuerst die Verschiedenheit der Sterine in Tier- und Pflanzenfetten festgestellt und sie zu ihrem Nachweise benutzt hatte, gelang es A. Bömer[2]) Ende der neunziger Jahre zum ersten Male in einer grundlegenden Arbeit darzulegen, daß alle Tierfette Cholesterin vom Schmelzpunkt 148,4° bis 150,8° und alle Pflanzenfette Phytosterine vom Schmelzpunkt 138,0° bis 143,8° enthalten. Weiter stellte er fest, daß die tierischen und pflanzlichen Sterine außer durch ihre charakteristischen Kristallformen[3]) vor allem auch durch die Schmelzpunkte ihrer Acetate[4]) scharf voneinander unterschieden werden können; er gründete darauf zur Unterscheidung von Pflanzen- und Tierfetten, sowie zum Nachweise der ersteren in letzteren die „Phytosterin"- und „Phytosterinacetatprobe".

Die Sterine sind ungesättigte sekundäre, hydroaromatische Alkohole von etwas wechselnder Molekulargröße. Im Gegensatz zum Cholesterin $(\alpha)_D = -31{,}6°$ und den Phytosterinen $(\alpha)_D = -36$ bis $-64°$, den Prototypen der beiden Steringruppen von der Formel $C_{27}H_{46}O$[5]), die wie die meisten bisher untersuchten Sterine des Pflanzenreiches linksdrehend sind, ist im Wollfett von E. Schulze[6]) ein stark rechtsdrehendes Sterin $(\alpha)_D = + 60°$, Isocholesterin, entdeckt worden, das bei 136,0° bis 138,0° schmilzt und mit Cholesterin isomer[7]) sein soll. Das Cholesterin steht in naher Beziehung zu den Gallensäuren und wird im tierischen Organismus aus ihnen neu gebildet. Nahe verwandt mit dem Cholesterin ist das Koprosterin, das ein Abbauprodukt desselben darstellt und sich in den Faeces findet. Nach A. Windaus[8]) ist es ein isomeres Dihydrocholesterin, nicht mit Digitonin fällbar und schmilzt bei 95° bis 104°. Oxycholesterin ist nach J. Lifschütz[9]) neben Metacholesterin als Begleiter des Handelcholesterins aufgefunden worden; es ist mit Digitonin schwer fäll-

---

1) Zeitschr. f. analyt. Chemie **26**, 557 (1887).
2) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **1**, 81 (1898).
3) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **1**, 21 u. 532 (1898).
4) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **4**, 1070 (1909).
5) Nachr. d. Ges. d. Wissensch. zu Göttingen, math. physik. Klasse 1919.
6) Journal f. pr. Chemie (2) 7, 163; Berichte d. dtsch. chem. Ges., **31**, 1200 (1889).
7) Ber. d. dtsch. chem. Ges., **47**, 2487 (1914).
8) Ber. d. dtsch. chem. Ges., **49**, 1724 (1916).
9) Ber. d. dtsch. chem. Ges., **41**, 253 (1908); **47**, 1453 (1914).

bar und schmilzt bei 100° bis 105°. Die Sterine geben außerdem charakteristische Farbreaktionen: Die Hager-Salkowski'sche Reaktion zeigt mit Chloroform- und konz. Schwefelsäure eine blutrote bis purpurne Färbung; die Säure fluoresziert dabei stark grünlich. Die Liebermann'sche Reaktion gibt in Chloroform-, Essigsäureanhydrid- und konz. Schwefelsäurelösung anfangs eine rosarote Färbung, die später in Blau übergeht (Cholesterin, Isocholesterin, Phytosterine).

Die Phytosterine des Pflanzenreiches kommen vor allem in fett- und ölhaltigen Samen und Früchten vor. Sie sind ebenfalls nicht einheitlich, sondern kommen als Gemische sich chemisch ähnlich verhaltender Alkohole in der Natur vor. Von ihnen sind bisher als linksdrehende, reine Körper durch die Untersuchungen von A. Windaus folgende nachgewiesen worden: Sitosterin $C_{27}H_{46}O$, Brassicasterin $C_{28}H_{46}O$ und Stigmasterin $C_{30}H_{50}O$; sie werden im zweiten Teile dieser Arbeit bei der Darstellung der Rübölsterine noch eingehender abgehandelt.

Das Ergosterin von der Formel $C_{27}H_{42}O$, der spezifischen Drehung $(\alpha)_D = -114°$ und dem Schmelzpunkt 154°, hat heute eine besondere Bedeutung dadurch erlangt, daß es nach A. Windaus und Pohl als dreifach ungesättigter Körper neben Sterinen in der Hefe, den Pilzen und dem Mutterkorn als Provitamin in größeren Mengen vorkommt, und durch Ultraviolettbestrahlung mit der Quarzquecksilberlampe infolge intramolekularer Umlagerung in das als Antirachitikum in der Therapie bekannte „Vitamin D" umgewandelt werden kann. Im Lebertran und Eigelb ist letzteres in hinreichenden Mengen vorhanden, und scheint der Gehalt an diesem Vitamin dem des Cholesterin parallel zu gehen, da Lebertran 0,5 bis 0,9% und Eieröl 5% Sterin enthalten.

Analytisch findet man die Sterine in der Fraktion des „unverseifbaren Anteils" der Fette. Wie bekannt, versteht man unter den „unverseifbaren Stoffen" oder dem „Unverseifbaren" schlechthin diejenigen Stoffe der natürlichen Fette und Öle, die weder in Wasser löslich sind, noch durch Verseifen mittels Alkalien in wasserlösliche Verbindungen übergeführt werden können. Bei pflanzlichen Fetten gehören zu den „unverseifbaren Stoffen" außer den Sterinen u. a. Farbstoffe, Kohlenwasserstoffe, Harze, und bei den Wachsen sind es neben den Sterinen und Kohlenwasserstoffen vor allem die Fettalkohole wie Cetyl-, Ceryl-, Myricylalkohol usw., die Bestandteile des „Unverseifbaren" ausmachen.

Die Gesamtmenge der Sterine läßt sich durch Ausschütteln der betreffenden Fettseifenlösung mit Äther nach A. Bömer[10]) gewinnen, doch werden bei dieser Arbeitsweise die genannten Körper mit eben genannten organischen Stoffen verunreinigt erhalten. Ein anderes Verfahren, die Sterine zu bestimmen, ist ihre Fällung durch das

10) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 1, 21 (1898).

Glykosid Digitonin, das nach A. Windaus [11]) schwer- bezw. unlösliche Verbindungen mit ihnen bildet; Marcusson und Schilling [12]) haben diese Methode später als analytische in die Fettchemie eingeführt.

In den Untersuchungen von Klostermann [13]) ist darauf hingewiesen worden, daß die Sterine teils frei, teils als Ester in der Natur vorkommen, und daß infolgedessen bei der direkten Sterinbestimmung mit Digitonin nur der freie, nicht aber der gebundene Anteil erhalten werden kann. Die Sterine sind nach A. Windaus einwertige, ungesättigte, sekundäre, hydroaromatische Alkohole, deren Hydroxylgruppe sich an einem Sechsring befindet, wodurch sie imstande sind, mit Säuren Ester zu bilden. Zur Gewinnung oder Bestimmung der Gesamt-Sterinmenge ist darum vorher die Verseifung des Fettes erforderlich, und erhält man die Ester einfach durch Subtraktion der freien Sterine von dem bei der Gesamt-Sterinbestimmung erhaltenen Wert.

In dieser Arbeit wurden die Sterinbestimmungen nach dem von Klostermann und Opitz [14]) modifizierten Digitoninverfahren ausgeführt. In Tabelle 1 ist der Gehalt an Sterinen in einigen natürlichen Fetten und Ölen nach Klostermann und Opitz [15]) (Nr. 1—5) und nach meinen Untersuchungen (Nr. 6—12) mitgeteilt.

Tabelle 1.

Nr.	Bezeichnung	Sterine in mg-%. Gesamt-Sterine	Freie Sterine	Gebundene Sterine
1	Leinöl I	416	197	219
2	Lebertran I	516	272	244
3	Sesamöl I	549,4	333,1	216,3
4	Mohnöl I	247,9	226,1	21,8
5	Rüböl I	345,0	48,6	296,4
6	Leinöl II	356	171	185
7	Lebertran II	766	260	506
8	Lebertran, gehärte andere Probe	231,8	83,9	147,9
9	Sesamöl II	454	211	243
10	Sesamöl, gehärtete andere Probe	280	163	117
11	Mohnöl II	300	213	87
12	Rüböl II	362	87	275

11) Ber. d. dtsch. chem. Ges., **41,** 2558 (1908); **42,** 238 (1909). Zeitschr. für physiol. Chemie **65,** 110 (1910).

12) Chem.-Ztg **37,** 1001 (1913).

13) Ztschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm., **26,** 433 (1913); Abderhalden, H. d. b. A. Berlin und Wien, **7,** 5, 198 ff. (1913); Ztschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm., **27,** 713, **28,** 138 (1914).

14) Ztschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm., **27,** 713 (1914).

15) Ztschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm., **28,** 138 (1914).

Tabelle 2.

Kennzahlen der untersuchten Fette.

Bezeichnung	Verseifungszahl	Jodzahl (Wijs)	Refraktion 25°	Gesamt-Unverseifbares nach A. Bömer, ( ) umkristallisiert in mg-%
Leinöl II	197,9	187,7	83,0 (40°)	—
Lebertran II	191,5	169,0	71,0	836 (561) Schmpkt. 144,8°
Lebertran, gehärt. andere Probe	—	—	—	577,5
Sesamöl II	194,1	108,8	—	—
Sesamöl, gehärt. andere Probe	197,3	0,3	—	555,0
Mohnöl II	197,8	144,6	73,5	—
Rüböl II	178,6	104,7	68,0 (40°)	539,5 (315) Schmpkt. 129,5°

Die Werte für Sterine schwanken bei der gleichen Fett- und Ölart, wie man sieht, unter Umständen beträchtlich. Von Bedeutung ist die Tatsache, daß die tierischen Fette und Öle im allgemeinen arm an Sterinen sind, und Ester nicht oder nur in Spuren enthalten, mit Ausnahme des Lebertrans, der verhältnismäßig reich an Sterinen ist und freie und gebundene Sterine in ungefähr gleichen Mengen enthält. Von den pflanzlichen Fetten und Ölen ist das Sesamöl am sterinreichsten, und enthalten diese Art Fette alle mehr oder weniger viel Ester. Von den Sterinestern sind bisher folgende synthetisch dargestellt worden:

Cholesterinester:

Cholesterinacetat
„ butyrat
„ oleat
„ stearat
„ palmitat
„ zinnamylat
Isocholesterinacetat
„ stearat
„ benzoat.

Cholesterinheptylat
„ nonylat
„ laurat
„ myristat
„ benzoat
Paracholesterinbenzoat
Cyclocholesterinacetat
„ n-butyrat

Phytosterinester.

α u. β Phytosterinformiat
„ „ acetat
„ „ propionat
„ „ n-butyrat
„ „ isobutyrat
„ „ n-valerat.

α Phytosterinisovalerat
„ capronat
„ caprylat
„ caprat

Im tierischen Körper sind unter anderem von A. Windaus [16]) Cholesterinpalmitat und -oleat in verfetteten Nieren, von C. Hürthle [17]) Cholesterinoleat in Blutserum und von E. Salkowski [18]) Cholesterinpalmitat in der Haut nachgewiesen worden.

Die Frage, wie sich die Sterine bezw. die Sterinester in Fettgemischen beim Hydrieren verhalten, war lange Zeit ungeklärt. Als ungesättigte Alkohole, die 2 Atome Halogen addierten (Jodzahl 65,7), konnte beim Cholesterin und Phytosterin angenommen werden, daß sie bei diesem Prozeß entweder in gesättigte Alkohole übergeführt würden, oder aber auch die Hydroxylgruppe selbst mit hydriert werden würde. Versuche in dieser Hinsicht haben ergeben, daß im allgemeinen bei den Sterinen die Hydrierung schwieriger erfolgt als bei den ungesättigten Glyceriden und Fettsäuren; bezüglich des Härtens hydroxylhaltiger ungesättigter Fettsäuren und Neutralfette konnte festgestellt werden, daß nach der Methode von Normann [19]) unterhalb 200° der Wasserstoff im wesentlichen nur an die Doppelbindung angelagert wird, wie zum Beispiel beim Ricinusöl, dagegen oberhalb 200 ° auch die Hydroxylgruppe mit reduziert wird. Nach Erdmann erfolgt bei dieser Temperatur bei Anwendung von Nickeloxyd als Katalysator die Reduktion der O H-Gruppe oft noch schneller als die der Doppelbindung. Die Hydrierung der Sterine beginnt nach Adamla [20]) bei Temperaturen über 170°; infolgedessen fand A. Bömer [21]) bei nach Wilbuschewitsch gehärteten Ölen (bei 100 bis 160°) die Sterine wenig verändert. Wie Marcusson und Meyerheim feststellten, ist beim Hydrieren der reinen Sterine nach Adamla das Phytosterin [22]) stabiler, indem es erst bei Temperaturen von über 250° in der Weise angegriffen wird, daß in der Hauptsache ein bei 102° bis 103° schmelzender, stark rechtsdrehender, gesättigter Kohlenwasserstoff $(\alpha)_D = + 48°$ als vollständig hydriertes Sterin gebildet wird, während bei 200° keine wesentliche Veränderung eintrat; dagegen fanden sie das Cholesterin schon bei 170° bis 200° zu 75% verharzt, und bei 250° waren überhaupt keine kristallinischen Hydrierungsprodukte des Cholesterins abscheidbar.

Wie sich die Fettsäure-Sterinester beim Härten in reinem Zustande verhalten werden, ist noch nicht bekannt. Sehr wahrscheinlich werden sie sich ähnlich verhalten wie die reinen Sterine, indem auch hier die Wasserstoffanlagerung am Sterinmolekül bei den Cholesterinestern eher erfolgt als bei den Phytosterinestern. Die Art der ungesättigten Fettsäure, die am Sterin verestert ist, spielt bei der Härtung wahrscheinlich eine besondere Rolle Wahrscheinlich werden, wie bei den ungesättigten Glyceriden, auch die stärker ungesättigten Ste-

16) Chem.-Ztg. **1**, 1753 (1909).
17) Ztschr. f. physikal. Chemie, **21**, 349 (1895); Biochem. Ztschr., **1**, 413 (1906).
18) Chem.-Ztg., **2**, 326 (1910).
19) Chem. Umschau, **23**, 99, 116 (1916).
20) Beitr. z. Kenntn. d. Cholesterin, Diss. Freiburg (1911/12).
21) Ztschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm., **24**, 104 (1912).
22) Ztschr. f. angew. Chemie, **27**, 201 (1913).

rinester bei der Härtung eher angegriffen, ebenso wie die stärker ungesättigten Fettsäuren als solche wegen ihrer leichten Angriffsmöglichkeit für den Wasserstoff immer eher hydriert werden, als das Sterinmolekül selbst. Die Charaktereigenschaften der Sterinester werden in chemischer Hinsicht je nach dem Grade der Hydrierung abnehmen oder ganz verloren gehen, ebenso wie die reinen Sterine. Das Verhalten der ungesättigten Fettsäuresterinester beim Hydrieren muß noch durch besondere Versuche geklärt werden, ehe über diese interessante Frage Aufschluß erhalten worden ist. Im Verlauf dieser Untersuchungen konnten aus Lebertran, der längere Zeit bei 145° bis 175° gehärtet worden war, keine Kristallisationsprodukte des Cholesterinester gewonnen werden, während solche des Phytosterinester aus Rüböl beim Härten bis 165° in geringen Mengen erhalten werden konnten.

Obige Ergebnisse der Veränderung der Sterine beim Härten wurden, wie Marcusson und Meyerheim[23]) fanden, mit reinen Produkten erzielt. In natürlichen Fetten konnten sie aus dem sterinfreien „Unverseifbaren" des bei höherer Temperatur nach dem Normann'schen Verfahren gewonnenen Lebertrans mit großer Wahrscheinlichkeit Oktodecylalkohol abscheiden, der bei 59,3° bis 59,8° schmolz und offenbar ein Zersetzungsprodukt des Cholesterins darstellt; das längere Härten bei höherer Temperatur bedingte eine Abnahme des Steringehaltes, und zwar fanden Marcusson und Meyerheim[24]) nach dem Normann'schen Verfahren eine Veränderung der Sterine derart, daß diese um so größer war, je stärker die Öle hydriert worden waren. Beim Tran fanden sie zum Beispiel folgende Kennzahlen:

Tabelle 3. Hydrierte Waltrane.

	Waltran Ausgangsöl	Talgol	Talgol extra	Candelite	Candelite extra
Erstarrungspunkt	flüssig	31°	38°	42°	45°
Jodzahl	114	67	36	20	13
Gesamt-Unverseifbares	0,9%	0,9%	0,9%	0,8%	0,7%
Steringehalt	0,13%	0,10%	0,07%	0,05%	0,02%
Spezifische Drehung der Sterine	— 24°	— 34°		—	—

Während sie aus gehärteten Tranen, wie „Talgol" und „Talgol extra" keine Umwandlungsprodukte des Cholesterin erhalten konnten, gelang ihnen dies beim Härten des reinen Sterins nach der Adamla'schen Vorschrift bei 195°; nach ihren Angaben gewannen sie hierbei hochschmelzendes Dihyrocholesterin in Ausbeute von etwa 25% des Ausgangsmaterials aus dem Hydrierungsprodukt, welches die Chole-

23) Ztschr. f. angew. Chemie **27**, 201 (1913); **1**, 201/8 (1914).
24) Ztschr. f. angew. Chemie, **27**, 201 (1913).

stolreaktion gab, farblos war und auf dem Wasserbade schmolz; die spezifische Drehung betrug $(\alpha)_D = + 4{,}7°$; aus bei 250° hydriertem reinem Cholesterin waren, wie eben mitgeteilt, weder aus Benzin noch aus Alkohol bei niederen Temperaturen irgendwelche festen Hydrierungsprodukte abscheidbar.

Beide Autoren bemerken, daß aus der für „Talgol" gefundenen inneren Jodzahl (107) bezüglich der Wasserstoffanlagerung zu schließen ist, daß die Härtung nicht ausgesprochen stufenweise derart verläuft, daß die am stärksten ungesättigten Säuren zunächst vollständig reduziert werden, sondern ein Teil der stark ungesättigten Fettsäure dürfte vielmehr auch dann noch unhydriert bleiben, wenn bereits die am wenigsten ungesättigte Ölsäure zum größten Teil in Sterinsäure übergeführt ist.

Folgende Tabelle von ihnen über den Gehalt an Gesamt-Unverseifbarem, sterinfreiem Unverseifbaren und Sterinen bietet eine gute Übersicht über die Eigenschaften verschiedener tierischer und pflanzlicher Fette in natürlichem und gehärtetem Zustande.

Tabelle 4.

Nr.	Bezeichnung	Gesamt-Unverseifbares %	Gesamt-Unverseifbares $(\alpha)_D$	Aus dem Digitonid berechnete Sterinmenge %	Sterinfreies Unverseifbares %
1.	Tran, braun, technisch	1,8	1,9	0,15	1,6
2.	Waltran, hellgelb	0,9	— 4,6	0,13	0,7
3.	Rindertalg	0,3	—12,0	0,03	0,2
4.	Erdnußöl	0,3	— 7,3	0,11	0,16
5.	Rüböl	0,4	—17,8	0,22	0,15
6.	Sesamöl	1,2	52,0	0,42	0,6
7.	Cottonöl	0,7	± 0	0,23	0,4
8.	Sojabohnenöl	0,6	—11,5	0,25	0,22
9.	Leinöl	1,0	1,0	0,38	0,6
10.	Rizinusöl	0,3	—15,8	0,13	0,13
11.	Talgol	0,9	— 1,9	0,10	0,7
12.	Talgol extra	0,9	— 3,3	0,07	0,7
13.	Candelite	0,8	4,7	0,05	0,7
14.	Candelite extra	0,7	1,4	0,024	0,64
15.	Cottonöl, Schmp. 32°	0,7	— 5,8	0,22	0,4
16.	Cottonöl, Schmp. 38°	0,6	± 0	0,14	0,4
17.	Leinöl	1,0	19,5	0,21	0,7
18.	Rizinusöl	0,3	—10,1	0,13	0,19

Aus gehärtetem Cottonöl und gehärtetem Leinöl erhielten Marcusson und Meyerheim nach dem Zerlegen des Digitonidniederschlages mit siedendem Xylol auf dem Wasserbade schmelzende Körper, deren spezifische Drehung $(\alpha)_D = — 16°$ und $(\alpha)_D = \pm 0°$ betrug. Bei gehärtetem Leinöl war aus dem Unverseif-

baren durch Auskristallisieren überhaupt kein Phytosterin mehr abscheidbar, wie die letztere Drehung zeigt, sondern nur ein bei 75° schmelzender Alkohol, wahrscheinlich ein Hydrophytosterin. Wurden die erhaltenen Digitonide aus gehärtetem Leinöl mit Essigsäureanhydrid zersetzt, so erhielten sie kein Acetat, sondern einen bei 102° bis 105° schmelzenden Kohlenwasserstoff, einen Körper, den sie auch beim Hydrieren des reinen Phytosterins bei 250° darstellten; er war stark rechtsdrehend $(\alpha)_D = + 48°$ und erwies sich als ein dem Phytosterin zugrunde liegender gesättigter Kohlenwasserstoff, der aus dem Sterin durch Wasserstoffanlagerung, sowohl an der Doppelbindung als auch an der Hydroxylgruppe entstanden war. Das Rohprodukt des bei 250° gehärteten, reinen Phytosterins drehte $(\alpha)_D = + 24{,}6°$; mit Digitonin waren nur 8% des Ausgangsmaterials ausfällbar.

I. Versuche zur Darstellung von Sterinestern aus Fetten und Ölen.

Aus den natürlichen Fetten und Ölen sind bisher noch keine Ester von Sterinen dargestellt worden; ich habe daher versucht, solche aus ihnen zu gewinnen und zu identifizieren.

Von tierischen Fetten kam nur Lebertran in Frage (0,25% Ester), von pflanzlichen Ölen erschien wegen des hohen Gehaltes an Estern das Rüböl geeignet (0,3% Ester). Da aber die Sterinester der höheren Fettsäuren löslicher sind als die Glyceride, war die Darstellung aus natürlichen Fetten und Ölen wenig aussichtsvoll, weil eine Trennung von den Glyceriden der ungesättigten Fettsäuren wegen deren leichter Löslichkeit durch Kristallisation so gut wie unmöglich war. Bessere Aussichten bot die Isolierung der Sterinester aus gehärteten Fetten und Ölen. Es wurden daher wegen des an und für sich höheren Gehaltes an Estern in erster Linie gehärteter Tran und gehärtetes Sesamöl verwendet. Es war klar, daß sich in diesen die Sterinester möglicherweise nicht in der natürlich vorhandenen Form vorfanden, sondern gebunden an gesättigte Fettsäuren, vorausgesetzt, daß das Sterin selber unverändert erhalten war; aber ein Schluß auf die natürlich vorhanden gewesenen Sterinester war immerhin möglich.

1. Versuche mit gehärtetem Sesamöl.

Der Gehalt an Sterinen betrug 280 mg-%, davon waren frei 163 mg-% und als Ester 117 mg-% vorhanden.

Vorversuche.

Der Zweck dieser Vorversuche war, zunächst durch Untersuchung der einzelnen Kristallisationen auf Sterine festzustellen, in welcher Fraktion sich die Ester der Sterine finden, damit später durch nähere Untersuchung Aufschluß über die Art und Eigenschaften der Ester erlangt würde.

Erster Vorversuch: Über die Art und Weise der Hydrierung dieses Fettes und auch des gehärteten Lebertrans bei Versuch 2 (S. 16) war nichts bekannt. Es sollte zunächst geprüft werden, in welchen Fraktionen sich bei fraktionierter Kristallisation der Glyceride die gebundenen Sterine befanden oder ansammelten. Es wurde dabei so verfahren, daß sowohl die Lösungsmittel in der Reihenfolge Aether, Aceton, Alkohol gewechselt, bezw. die betreffenden Lösungen eingeengt, als auch die Kristallisationstemperaturen erniedrigt wurden. Die auf diese Weise abgeschiedenen Glyceride wurden gewogen und darin Sterinbestimmungen ausgeführt. Es sei bemerkt, daß hierbei die Bestimmung der freien Sterine insofern Schwierigkeiten bot, als wegen der vorhandenen großen Menge schwerlöslicher, gesättigter Glyceride diese bei Anwendung der üblichen Menge Aether-Petrolaether mit dem Digitoninsterid ausfielen. Es mußten daher größere Mengen Lösungsmittel oder geringere Mengen Substanz angewendet werden.

Fraktionierte Kristallisation von 20 g gehärtetem Sesamöl.

Es wurden zweimal 10 g des Fettes getrennt unter den gleichen Bedingungen fraktioniert kristallisiert und die Parallelfraktionen vereinigt.

Tabelle 5.

Fraktion	Art und Menge des Lösungsmittels ccm	Kristallisations- Temperatur °	Kristallisations- Dauer Stunden	Glyceridmenge	Gesamt-Sterine In der Fraktion Menge mg	Gesamt-Sterine In der Fraktion mg-%	Gesamt-Sterine in % der Gesamt-Sterinmenge d. Fettes
I.	200 Aether	15—20	2	15,0	0	0	0
II.	200 Aether	0	1½	2,7	Spuren		—
III.	100 Aether	—10 bis —15	2	0,64	Spuren		—
IV.	50 Aceton	0	2	0,52	14,6	2808	26,1
V.	50 Aceton	—8 bis —10	2	0,18	0,80	250	1,4
VI.	30 Aceton	—8 bis —10	2	0,14			
VII.	50 Alkohol	15—20	48	0,11	0	0	0
VIII.	50 Alkohol 5 Wasser	15—20	48	0,19	2,1	1080	3,7
IX.	Mutterlauge	—	—	0,42	21,5	5120	38,4
		Zusammen:			39,0	—	69,6

Zweiter Vorversuch: Durch den ersten Versuch war bekannt geworden, daß die Sterine zum Teil in der Acetonfraktion ausfielen, zum Teil sich aber bis zur Alkohol-Fraktion bezw. in der Mutterlauge ansammelten. Es wurde nun eine größere Menge des gehärteten Fettes verwandt, die Ausbeuten an festen Glyceriden gewogen und die zugehörigen Schmelzpunkte ausgeführt.

Fraktionierte Kristallisation von 100 g gehärtetem Sesamöl.
Tabelle 6.

Fraktion	Art und Menge des Lösungsmittels ccm	Kristallisations- Temperatur °	Kristallisations- Dauer Stunden	Menge der Glyceride g	Schmelzpunkte °
I.	1000 Aether	15—20	2	—	66
II.	1000 Aether	0	2	—	63
III.	1000 Aether	—10 bis —12	2	—	65
IV.	500 Aether	—10 bis —12	2	5,0	65
V.	100 Aceton	17,5	12	0,4	83
VI.	100 Aceton	0	2	2,6	41
VII.	100 Aceton	—10 bis —15	2	0,7	47
VIII.	50 Aceton	0 bis —10	2	0,4	33
IX.	Mutterlauge	—	—	0,8	flüssig

Die Mutterlauge IX (0,8 g), bei der auch aus Alkohol feste Glyceride nicht mehr gewonnen werden konnten, wurde auf ihren Gehalt an Gesamt- und freien Sterinen untersucht. Das Ergebnis war folgendes:

Tabelle 7.

		Freie Sterine	Gesamt-Sterine
Angewandte Substanz		0,4085 g	0,4155 g
Digitoninsterid		0,1505 g	0,1510 g
Sterin		36,6 mg	36,7 mg
Sterine in Prozenten	der angewandten Substanz	8,96	8,84
	der freien Sterine des Fettes	45%	—
	des Fettes	73,8 mg-%	72,7 mg-%

Da die gefundenen Werte für Gesamt- (72,7 mg) und freie Sterine (73,8 mg) fast vollständig übereinstimmen, waren demnach in der Mutterlauge IX nur freie Sterine vorhanden, was der Leichtlöslichkeit der Sterine entspricht.

Zur Untersuchung auf Sterinester, die nach dem ersten Vorversuch in der Acetonfraktion angehäuft zu sein schienen, wurde die Acetonfraktion V des zweiten Vorversuches (0,4 g), welche durch ihren hohen Schmelzpunkt 83° aus der Reihe der Schmelzpunkte der übrigen Fraktionen herausfiel, zweimal aus wenig Aether umkristallisiert und hierbei 0,0765 g Kristalle vom Schmelzpunkt 91° erhalten. Diese Kristalle wurden mit 10 ccm alkoholischer Kalilauge eine halbe Stunde verseift, mit 10 ccm Wasser in einen Scheidetrichter übergeführt, zweimal mit 25 ccm Aether ausgeschüttelt, nach Auswaschen der Aetherlösung diese in einen Erlenmeyerkolben filtriert, der Aether abdestilliert und der Rückstand getrocknet und gewogen = 0,073 g; der Rückstand wurde in 5 ccm Alkohol unter Erwärmen gelöst und die ausgeschiedenen Kristalle nach 24 Stunden abfiltriert; nach Lösen in 25 ccm Aether, nochmaligem Auswaschen, Filtrieren und Abdestillieren des Aethers wurde der Rückstand nochmals aus 5 ccm Alkohol kristallisiert, Schmelzpunkt 112°.

Die Seifenlösung wurde angesäuert, zweimal mit 20 ccm Aether ausgeschüttelt, filtriert und getrocknet (0,034 g). Die Substanz wurde

nach dem Lösen in 5 ccm Alkohol nach 24 Stunden abfiltriert, nochmals in 5 bis 10 ccm Alkohol gelöst, auf die Hälfte eingedampft und die Kristalle abfiltriert. Schmelzpunkt 68°.

Die Fraktionen VI bis VIII wurden zur Entfernung etwaiger freier Fettsäuren in 50 ccm Aether gelöst, im Scheidetrichter mit wässeriger 0,1 N-Kalilauge unter Phenolphthaleinzusatz bis zur Rotfärbung neutralisiert; nach Abdestillieren des Aethers war der Schmelzpunkt des Rückstandes 53°, aus 50 ccm Aceton umkristallisiert schmolzen die Kristalle bei 60°.

Nach diesen Untersuchungen hatte sich ergeben, daß die Sterinester sich nach dem Wechseln des Lösungsmittels (Aether→Aceton) als in Aceton unlöslich abgeschieden hatten; der Schmelzpunkt des Sterinesters betrug 112° und der der daraus gewonnenen Fettsäure 68° (Stearinsäure). Die freien Sterine dagegen hatten sich, wie aus der Sterinbestimmung von Mutterlauge IX zu ersehen ist, wegen ihrer leichten Löslichkeit in dieser angesammelt.

Hauptversuch.

Darstellung von größeren Mengen von Sterinestern.

Um auf Grund der Ergebnisse der Vorversuche größere Mengen der Sterinester zwecks eingehender Untersuchung darzustellen, wurden 500 g gehärtetes Sesamöl in Mengen von je 100 g in gleicher Weise wie in den Vorversuchen fraktioniert kristallisiert.

Die Ergebnisse waren folgende:

Tabelle 8.

Fraktionierte Kristallisation von 500 g gehärtetem Sesamöl.

Fraktion	Art und Menge des Lösungsmittels ccm	Kristallisations- Temperatur °	Dauer Stund.	Menge d. Krist. aus 400 g	Schmelzpunkte der Kristalle °	Gesamt-Sterine in der Fraktion Menge mg	mg-%	in % der Gesamt-Sterine d. Fettes
I.	4000 Aether	15—20	3	—	—	—	—	—
II.	2000 Aether	15—20	12	—	—	—	—	—
III.	2000 Aether	0	2	—	—	—	—	—
IV.	400 Aether	—10 bis —15	2	8,0*)	61	60,8	760	5,4
	Mutterlaugen			20,5 aus Aceton kristallisiert.				
				Aus 500 g				
V.	750 Aceton	15—20	2	—	82	—	—	—
VI.	750 Aceton	15—20	12	—	60	—	—	—
VII.	750 Aceton	0	½		38	—	—	—
VIII.	750 Aceton	—10 bis —15	1½		55	86,3	886	6,2
IX.	300 Aceton	17,5	12	9,74	—	davon freie Sterine 51,3	527	—
X.	300 Aceton	0	1		43	—	—	—
XI.	300 Aceton	—10 bis —15	2		48	—	—	—
XII.	300 Mutterlauge			6,75		—	—	—

*) Menge der Glyceride von nur 400 g; die Glyceride der weiteren 100 g wurden erst von der Fraktion V an mit den Kristallisationen der 400 g vereinigt.

Die Fraktion V vom Schmelzpunkt 82°, in der nach den Vorversuchen Ester des Sterins erwartet werden konnten, wurde zwecks deren Reindarstellung zunächst einer fraktionierten Lösung unterworfen. Die Ergebnisse waren folgende:

Tabelle 9.

Fraktionierte Lösung der Kristalle 82°.

Nr. der Kristallisation	Art und Menge des Lösungsmittelts ccm	Kristallisations- Temperatur °	Kristallisations- Dauer Stunden	Hauptkristalle Schmelzpunkt °	Kristalle der Mutterlauge Schmelzpunkt * °	Kristalle der Mutterlauge Menge g
1.	50 Aceton	0	½	85	42	0,13
2.	50 Aceton	0	½	87	30	0,10
3.	50 Aceton	0	½	88	32	0,10
4.	50 Aceton	0	½	90,5	45	0,07
5.	50 Aceton	0	½	90,5	—	0,07

*) Aus den Kristallen der Mutterlaugen konnten nach Vereinigung und Lösung in 25ccm Aceton höher schmelzende Anteile nicht erhalten werden.

Die Kristalle vom Schmelzpunkt 90,5° wurden aus 50 ccm Aether bei Zimmertemperatur umkristallisiert und hatten dann den Schmelzpunkt 93 bis 94°; die Mutterlauge wurde vom Aether befreit; der Rückstand, aus Aceton umkristallisiert, lieferte Kristalle vom Schmelzpunkt 85°, während sich nach einstündigem Stehen der Mutterlauge bei 0° Kristalle (0,09 g) vom Schmelzpunkt 40° abschieden. Die Kristalle vom Schmelzpunkt 85° (0,31 g) ergaben aus 10 ccm Äther bei 0° umkristallisiert nach einer Stunde die Abscheidung von Kristallen vom Schmelzpunkt 92° (0,09 g).

Untersuchung der Kristalle vom Schmelzpunkt 93 bis 94°.

Wie die Voruntersuchung ergeben hatte, stellen die aus der Acetonfraktion gewonnenen seidenglänzenden Kristalle vom Schmelzpunkt 93 bis 94° Sterinester dar. Die nachfolgende Tabelle zeigt den prozentischen Gehalt der Sterinester der Fettsäuren an Sterinen und Fettsäuren, sowie die theoretische Verseifungszahl dieser Ester, z. B. für Phytosterinester von der Formel $C_{27}H_{46}O$. x (x = Säurerest):

Tabelle 10.

Bezeichnung	Sterin in % (mit OH-Gruppe)	Säure in % (mit H-Atom)	Theoretische Verseifungszahl:
Phytosterinbutyrat	84,64	19,30	122,9
„ capronat	79,75	23,96	115,8
„ caprylat	75,39	28,12	109,5
„ caprinat	71,47	31,86	103,8
„ laurat	67,95	35,21	98,7
„ myristat	64,77	38,25	94,1
„ palmitat	61,85	41,03	89,8
„ stearat	59,20	43,56	86,0
„ oleat	59,38	43,39	86,2
„ linolat	59,56	43,21	86,5

Zur Bestimmung der Verseifungszahl wurde die bei 105° getrocknete Substanz (0,3855 g) mit 25 ccm alkoholischer Kalilauge eine halbe Stunde verseift; da nach dieser Zeit noch Bestandteile ungelöst geblieben waren, wurden 10 ccm Xylol hinzugefügt und nochmals eine halbe Stunde verseift.

Angewendete Substanz:	Verbrauch an Kaliumhydroxyd:	Verseifungszahl:
0,3855 g	0,03204 g	83,1

Die gefundene Verseifungszahl 83,1 liegt demnach am nächsten der des Sterinesters der Stearinsäure (theoretische Verseifungszahl 86,0) und der Ölsäure (86,2).

Sterinbestimmung: Der Inhalt des Verseifungskölbchens wurde alkalisch gemacht und das Xylol durch Erhitzen auf dem Wasserbade und Einblasen von Luft entfernt; dann wurde die Lösung in einem Schütteltrichter mit 25 ccm Äther ausgeschüttelt, die Ätherlösung mit Wasser gewaschen und nach dem Filtrieren der Äther abdestilliert. Spuren von Wasser wurden mit absolutem Alkohol entfernt und der Rückstand bei 105° getrocknet. Der Gehalt an so gewonnenem Sterin betrug 0,2645 g; es besaß eine hellbraune Farbe und schmolz bei 122°. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Alkohol zeigten die Kristalle den Schmelzpunkt 131°.

Säurebestimmung und Neutralisationszahl: Die mit Äther ausgeschüttelte Seifenlösung wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert und die Fettsäure mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde mit Wasser gewaschen, filtriert und der Äther abdestilliert, eine halbe Stunde bei 105° getrocknet und nach dem Erkalten gewogen. Die erhaltene Säure wog 0,1160 g. Zu ihrer weiteren Untersuchung wurde zuerst die Neutralisationszahl bestimmt; zu dem Zwecke wurde die Fettsäure mit 25 ccm alkoholischer Kalilauge eine halbe Stunde verseift und der Überschuß an Alkali in üblicher Weise zurücktitriert. Diese Bestimmung wurde nochmals wiederholt.

Angewendete Substanz:	Verbrauch an Kaliumhydroxyd:	Neutralisationszahl
1. 0,1160 g	0,02361 g	203,6
2. 0,1155 g	0,02361 g	204,4

Auch hier kommen die gefundenen Werte der theoretischen Neutralisationszahl der Stearinsäure (197,3) unter Berücksichtigung der angewendeten geringen Substanzmenge ziemlich nah.

Zur Schmelzpunktbestimmung wurde der Inhalt nach der zweiten Verseifung im Scheidetrichter mit verdünnter Salzsäure angesäuert und die in Freiheit gesetzte Säure mit Äther extrahiert. Nach dem Umkristallisieren des Rückstandes aus 2 bis 3 ccm Alkohol zeigte die Substanz den Schmelzpunkt der Stearinsäure, nämlich

69,5°. Hiernach ergab die Untersuchung, daß der vorliegende Stoff der Phytosterinester der Stearinsäure war.

Die Abweichung der Verseifungszahl (83,1) von der theoretischen Verseifungszahl des Phytosterinstearats (86,0) dürfte auf die Unsicherheit der Bestimmung mit nur 0,3855 g Substanz und auf die Schwerverseifbarkeit des Esters zurückzuführen sein.

2. Versuche mit gehärtetem Lebertran.

Der gehärtete Tran II enthielt 231,8 mg-% Gesamt-Sterin, von denen 83,9 mg-% frei und 147,9 mg-% in gebundener Form vorhanden waren.

Es wurde versucht, auch aus diesem gehärteten Lebertran durch fraktionierte Kristallisation Sterinester darzustellen. Bei der Untersuchung wurde wie beim gehärteten Sesamöl verfahren, indem die Glyceride durch fraktionierte Kristallisation bei nach und nach erniedrigter Temperatur und durch nachfolgende Wahl eines weniger lösenden Mittels in der Reihenfolge Äther→Aceton→Alkohol abgeschieden wurden. Die Ergebnisse waren folgende:

Tabelle 11.

Franktionierte Kristallisation des gehärteten Lebertrans.

Es wurden 500 g in Mengen von je 100 g in 1000 cm Aether gelöst und vor der Fraktion V die Destillationsrückstände der fünf Mutterlaugen vereinigt; es waren zusammen 20,0 g.

Fraktion	Art u. Menge des Lösungsmittels ccm	Kristallisations-Temperatur °	Abgeschiedene Glyceride: Dauer St.	Menge g	Schmelzpunkte °	Gesamt-Sterin in d. Fraktion: mg	mg-%	in % der Gesamt-Sterine des Fettes %	Freie Sterine in d. Fraktion: mg	mg-%	in % der Gesamt-Sterine des Fettes %
I.	5000 Aether	15—20	3	—	69,5	—	—	—	—	—	—
II.	2500 Aether	0	2	—	60,6	—	—	—	—	—	—
III.	2500 Aether	—10	2	4,2	68,0	1,9	45,2	0,2	—	—	—
IV.	1250 Aether	—10	2	2,2	67,5	1,8	81,8	0,2	—	—	—
V.	200 Aceton*)	15—20	12	0,2	59,0	—	—	—	—	—	—
VI.			5	2,0	66,5	—	—	—	—	—	—
VII.			3	1,4	86,0	—	—	—	—	—	—
VIII.	200 Aceton	0	1		51,0						
IX.	200 Aceton	—10 bis —12	2	9,6	49,0	108,2	1127,1	9,3	41,2	429,2	10
X.	100 Aceton	0	1		50,5						
XI.	100 Aceton	—10	1½		48,3						
	Mutterlauge		—	5,5	—	347,2	6312,7	30,0	300,3	5460,0	72

*) Die Fraktionen V bis VII wurden nach längerem Stehenlassen der ersten Lösung (200 ccm Aceton) nach und nach ausgeschieden.

Da in der Fraktion V vom Schmelzpunkt 86°, entsprechend den Untersuchungsergebnissen beim gehärteten Sesamöl, Sterinester

zu vermuten waren, wurde sie einer fraktionierten Lösung in Verbindung mit fraktionierter Kristallisation unterworfen. Es wurde dabei so verfahren, daß die bei jeder fraktionierten Lösung erhaltenen Kristalle ihrer Menge nach bestimmt und ihre Schmelzpunkte ermittelt wurden. Aus den Mutterlaugen wurde das Lösungsmittel abdestilliert und von dem Rückstande der Schmelzpunkt bestimmt.

Tabelle 12.

Fraktionierte Lösung und Kristallisation von Fraktion V. 1,43 g vom Schmelzpunkt 86,0°.

Fraktion	Art u. Menge des Lösungsmittels ccm	Kristallisations-Temperatur °	Kristallisations-Dauer Stunden	Kristalle Menge g	Kristalle Schmelzpunkt °	Rückstand aus der Mutterlauge Menge g	Rückstand aus der Mutterlauge Schmkpt. °	
1.	200 Aceton	15—20	12	1,21	87,5	0,22	48,5	
2.	150 Aceton	0	½	1,16	87,2	0,03	56,5	
3.	150 Aceton	0	½	1,14	87,4	—	59,3	
4.	125 Aceton	0	½	1,10	87,6	0,02	62,4	
5.	50 Aether	15—20	½	0,30	93,3			
6.	50 Aether	0	½	0,47	85,0			Fraktionierte
7.	25 Aether +55 Aceton	0	1	0,08	75,4*)			Kristallisation von Fraktion 4
8.	Desgl.	15—20	12	0,18	85,7			
5a.	50 Aether	15—20	2	0,11	94,6			
5b.	50 Aether	0	2	0,06	94,1			Fraktionierte
5c.	25 Aether + 25 Aceton	15—20	6	0,09	93,6			Kristallisation von Fraktion 5
5d.	25 Aceton	—10 bis —12	½	0,04	82,8**)			

*) Der Schmelzpunkt 75,4° blieb auch nach zweimaligem Umkristallisieren aus Aceton bei Zimmertemperatur bezw. aus Aether-Aceton bei 0° bestehen.

**) Der Schmelzpunkt nach dem Umkristallisieren aus 10 ccm Aceton bei Zimmertemperatur betrug 83,0°.

a) Untersuchung der Fraktionen 5a—c.

Die Kristalle der Fraktionen 5 a, b, c wurden vereinigt und aus 75 ccm Aceton bei Zimmertemperatur umkristallisiert; die Menge betrug 0,2235 g, der Schmelzpunkt 94,3°.

Da in diesen Kristallen ein Sterinester vermutet wurde, wurden sie bei 105° eine halbe Stunde getrocknet und unter Zusatz von Benzol ihre Verseifungszahl bestimmt:

Angewendete Substanz:	Verbrauch an Kaliumhydroxyd:	Verseifungszahl:
0,2170 g	0,0211 g	97,2

Die Seifenlösung wurde mit Kalilauge alkalisch gemacht, auf dem Wasserbade das Benzol verjagt, die Lösung mit 10 ccm Wasser

in einen Scheidetrichter übergeführt und die Lösung 3 mal mit 25 ccm Äther ausgeschüttelt; die vereinigten Ätherausschüttelungen wurden mit Wasser gewaschen und in einem gewogenen Kolben der Äther abdestilliert; der Rückstand wurde bei 100° eine halbe Stunde getrocknet. Gewicht des Rückstandes: 0,1430 g. Die Substanz hatte ein hellgelbliches Aussehen, war von zäher, harzartiger Konsistenz und zeigte den Schmelzpunkt 123,5°. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus absolutem Alkohol stieg der Schmelzpunkt auf 128,5°. Mikroskopisch waren keine Cholesterinkristallformen zu erkennen. Diese Tatsache und der niedrige Schmelzpunkt deuten auf ein hydriertes Cholesterin hin, das, wie Marcusson und Meyerheim fanden, durch Hydrierung bei höherer Temperatur entsteht; sie konnten aus bei 250° hydriertem reinem Cholesterin überhaupt keine kristallinischen Produkte mehr gewinnen.

Aus der mit Äther ausgeschüttelten Seifenlösung wurde in üblicher Weise die Fettsäure abgeschieden; ihre Menge betrug nach dem Trocknen bei 105° 0,0870 g, der Schmelzpunkt war 69,2°.

Angewendete Substanz:	Verbrauch an Kaliumhydroxyd:	Neutralisationszahl:
0,0870 g	0,0155 g	178,4

Die Kristalle vom Schmelzpunkt 94,3° enthielten demnach 65,9% Sterin und 40,1% Fettsäure.

b) Untersuchung der Fraktionen 6 und 7.

Die Kristalle der Fraktionen 6 und 7 mit den Schmelzpunkten 85,0° und 85,7° wurden vereinigt und aus 75 ccm Aceton umkristallisiert; Schmelzpunkt 85,7°; ihre Menge betrug nach dem Trocknen bei 105° 0,580 g. Unter Zusatz von 25 ccm Benzol wurde mit alkoholischer Kalilauge verseift.

Angewendete Substanz:	Verbrauch an Kaliumhydroxyd:	Verseifungszahl:
0,5800 g	0,0880 g	151,8

α) Untersuchung des Sterins: Die Seifenlösung wurde alkalisch gemacht und das Benzol durch Erwärmen auf dem Wasserbade verjagt. Die alkalische Lösung wurde mit 10 ccm Wasser in einen Scheidetrichter übergeführt und dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherlösungen wurden mit Wasser gewaschen und der Äther abdestilliert; der Rückstand wurde nach Aufnehmen mit wenig absolutem Alkohol und dessen Verdunstung eine halbe Stunde bei 105° getrocknet und gewogen; es waren 0,1770 g mit dem Schmelzpunkt 123,2°. Die Kristalle sahen gelblichweiß aus und waren von zäher, harzartiger Beschaffenheit. Nach dem Umkristallisieren aus Alkohol schmolzen sie bei 124,9°. Dieses Sterin sowie das unter a beschriebene vom Schmelzpunkt 123,5° wurden bis zum Substanzverbrauch umkristallisiert und ergaben hierbei folgende Schmelzpunkte:

Tabelle 13.

Schmelzpunkt der Sterine	Steride vom Schmelzpunkt 94,3°	85,7°
Direkt	123,5°	123,2°
Nach dem 1. Umkristallisieren	124,9°	124,9°
„ „ 2. „	128,5°	123,7°
„ „ 3. „	127,5°	120,2°
„ „ 4. „	131,6°	120,2°

Auch nach dem viermaligen Umkristallisieren zeigten beide Sterine nicht die Kristallform des Cholesterins.

β) Untersuchung der Fettsäuren: Die durch Ausschütteln mit Äther vom Sterin befreiten Seifenlösungen wurden mit Salzsäure angesäuert, zweimal mit Äther ausgeschüttelt, die vereinigten Ätherlösungen mit Wasser gewaschen und in einen gewogenen Kolben filtriert. Der Äther wurde abdestilliert. Der Rückstand betrug nach halbstündigem Trocknen bei 105° 0,3895 g.

Es ergibt sich demnach für das Sterid eine Ausbeute von 30,5% Sterin und 67,2% Säure. Die Bestimmung der Neutralisationszahl der Säure, ausgeführt nach Art der Bestimmung der Verseifungszahl, ergab:

Angewendete Substanz:	Verbrauch an Kaliumhydroxyd:	Neutralisationszahl:
0,3895 g	0,0816 g	207,0

Zur weiteren Identifizierung wurden die Fettsäuren, gleichzeitig mit den nach a erhaltenen, mit der Neutralisationszahl 178,4 aus den Seifenlösungen in der üblichen Weise abgeschieden; sie hatten eine schwach bräunliche Farbe und den Schmelzpunkt 63,6°. Sie wurden mit absolutem Alkohol fraktioniert gelöst; hierbei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Tabelle 14.

Schmelzpunkt der Säuren	Steride vom Schmelzpunkt 94,3°	85,7°
Direkt	69,2°	63,6°
Nach dem 1. Umkristallisieren	70,6°	67,7°
„ „ 2. „	70,7°	68,4°
„ „ 3. „	70,5°	(66,8°)
Schmelzpunkte der in den Mutterlaugen gelösten Säuren:		
Nach dem 1. Umkristallisieren	67,6°	61,3° *)
„ „ 2. „	70,2°	67,0°

*) Beim Umkristallisieren ergaben sich Kristalle vom Schmelzpunkt 67,6°, während aus der Mutterlauge hiervon solche vom Schmelzpunkt 59,5° erhalten wurden.

Die Untersuchungen der aus dem gehärten Tran durch fraktionierte Kristallisation erhaltenen Fraktionen von den Schmelzpunkten 94,3° und 85,7° haben demnach folgendes ergeben:

1. Die Fraktion vom Schmelzpunkt 94,3° besteht im wesentlichen aus einem Stearinsäure-Sterid. Das Sterin ist aber nach seiner Kristallform kein unverändertes Cholesterin, sondern wahrscheinlich ein hydriertes Cholesterin oder ein Gemisch von beiden.

2. Die Fraktion vomSchmelzpunkt 85,7° enthält ebenfalls beträchtliche Mengen eines Sterides, besteht daneben aber auch noch aus einem Glycerid der Stearinsäure und Palmitinsäure.

3. Versuche zur Darstellung von Sterinestern aus selbstgehärtetem Lebertran.

Um festzustellen, wie sich die Sterinester des Lebertrans beim Hydrieren verhalten, und ob sie sich in ähnlicher Weise wie bei dem bereits untersuchten gehärteten Lebertran isolieren lassen, wurde wie folgt verfahren: Als Wasserstoffüberträger wurde Palladium verwendet und der Lebertran bis zur Konstanz der Refraktion längere Zeit bei Temperaturen bis 175° hydriert. Die Herstellung des Katalysators erfolgte in einer Stärke von 1 : 60 auf Kieselgur nach dem von A. Bömer[1]) im Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden von Abderhalden beschriebenen Verfahren. Von der Katalysatormasse wurden 15 g auf 250 g Öl genommen, entsprechend einem Gehalte von 0,1% Palladium. Der zur Hydrierung verwendete komprimierte elektrolytische Wasserstoff wurde zwecks Reinigung durch eine Waschflasche mit 6%iger Kaliumpermanganatlösung und anschließend durch eine solche mit konzentrierter Schwefelsäure geleitet. Ein 400 ccm-Glaskolben mit weitem Hals ruhte mittels Stativ in einem Ölbade; durch den Korkstopfen führte ein zu einer Spitze ausgezogenes Wasserstoffzuleitungsrohr bis auf den Boden des Kolbens, durch eine zweite Öffnung ragte ein Thermometer in das zu härtende Öl hinein und durch die dritte Öffnung führte ein Wasserstoffgasableitungsrohr ins Freie. Der Lebertran wurde in dem Ölbade auf 140—155° erhitzt und durch den Wasserstoffgasstrom in lebhaft wallender Bewegung gehalten, wobei der Katalysator gleichmäßig durch die ganze Masse verteilt wurde. Von dem Lebertran wurden 3 mal je 250 g mit 15 g des Katalysators hydriert. Die Kennzahlen des verwendeten Lebertrans waren folgende:

---

1) A. Bömer in Abderhaldens Handbuch d. biol. Arbeitsm. S. 545 ff.

Tabelle 15.

Verseifungszahl	Jodzahl (Wijs)	Refraktion 40°	Gesamtes Unverseifbares %	Sterine in mg-%			Schmelzpunkt des Sterins °
				Gesamte	freie	als Ester	
191,5	169,0	71,0,	0,836	766	260	506	144,8

Erste Hydrierung.

Die folgende Tabelle zeigt den Verlauf der Hydrierung.

Tabelle 16.

1. Probe			2. Probe		
Hydrierungszeit Stunden	Refraktion bei 40° (Blaue Linie)		Hydrierungszeit Stunden	Refraktion bei 40° Blaue Linie	Schwarze Linie
0	71,0		0	71,0	73,5
2	70,5		5	68,0	71,0
4	68,5		15	63,5	66,0
6	66,5		30	58,5	60,5
8	64,5		41	57,0	58,0
10	64,0		48	56,5	57,0
13	63,2				
15	62,5			3. Probe	
19	61,0		0	71,0	73,5
25	58,5		11	66,0	67,0
30	57,5		26	60,5	62,0
31	57,5	Schwarze	45	56,0	57,0
34	57,2	Linie	39	57,5	58,5
41	56,0	57,0			
36	56,5	56,5			

Nach 30stündigem Hydrieren war die Masse beim Erkalten bereits fest geworden. Bei Beendigung des Reduktionsprozesses wurde nach dem Entfernen des Katalysators ein Fett von gelber Farbe und angenehmen Geruch erhalten; der tranige Geruch und Geschmack war durch das Härten vollkommen verloren gegangen.

Die Kennzahlen des hydrierten Lebertrans waren folgende:

Tabelle 17.

Schmelzpunkt °	Verseifungszahl	Jodzahl (Wijs)	Refraktion 40°	Sterine in mg-%		
				Gesamte	freie	als Ester
29,1—30,6	191,2	92,3	57,0	597,5	165,3	432,2

Hieraus ist zu ersehen, daß nach 41- bis 48stündiger Hydrierung die Jodzahl auf 92,3 und die Refraktion auf 57,0 gesunken war, der Schmelzpunkt war dementsprechend gestiegen. Der Gehalt an Gesamt-Sterinen dagegen sank auf 78% der ursprünglich vorhandenen;

von den freien Sterinen wurden nur 63,5% und von den Estern 85,4% wiedergefunden. Es zeigte sich also beim Hydrieren eine stärkere Abnahme bei den freien als bei den gebundenen Sterinen. Zur Gewinnung von Sterinestern wurden 500 g hydrierter Lebertran fraktioniert kristallisiert, und zwar je 100 g aus je 500 ccm Äther.

Die Ergebnisse waren folgende:

Tabelle 18.

Fraktionierte Kristallisation von 500 g gehärtetem Lebertran.

Fraktion	Art u. Menge des Lösungsmittels ccm	Kristallisations-Temp. °	Kristallisations-Dauer Stund.	Kristalle Menge g	Kristalle Schmelzpunkt °	in 5 g mg	Gesamt-Sterine i. d. raktion mg	Gesamt-Sterine i. d. raktion mg-%	in % d. Ges.-Sterine d. gehärtet. Fettes
I.	2500 Aether	15—20	4	0	—	—	—	—	—
II.	1250 Aether	0	2	36,0	44,1	3,8	27,4	76,1	0,9
III.	1250 Aether	—10 bis —15	2	72,2	35,2	3,3	47,6	65,9	1,6
IV.	625 Aether	—10 bis —15	2	97,7	24,8	11,8	230,6	236,0	7,9
V.	In der Mutterlauge			290,5	flüssig	44,2	2568,0	884,0	86,0
							Freie Sterine:		
						12,8	743,7	256,0	90,0

Zweite Hydrierung.

275 g der Mutterlauge V wurden nochmals mit 16,5 g Palladiumkieselgur (1 : 60), entsprechend 0,1% Palladium, 20 Stunden im Ölbade bei 140 bis 155° hydriert; die Refraktion blieb schon nach kurzer Zeit konstant.

Tabelle 19.

Hydrierungszeit Stunden:	Refraktion bei 40° Blaue Linie	Schwarze Linie
10*)	60,5	61,5
15	60,5	61,0
20	60,5	61,0

*) Nach 10stündiger Hydrierung hatte die Masse eine dickflüssige Konsistenz angenommen.

Im Refraktometer war der Übergang von der blauen zur schwarzen Grenzlinie nicht mehr scharf zu erkennen.

Nach 20stündigem Hydrieren wurde eine dickflüssige, dunkelbraune Masse (261 g) erhalten, aus der sich beim Erkalten keine wesentlichen festen Bestandteile mehr abschieden; der gesamte Rückstand wurde darum im Ölbade bis 165° weiter hydriert.

Dritte Hydrierung.

260 g des nach dem Filtrieren im Wasserdampf-Trockenschrank erhaltenen Lebertranes der zweiten Hydrierung wurden mit 15,6 g der Katalysatormasse, entsprechend 0,1% Palladium, nunmehr bei 165° weiter hydriert. Da die Grenzlinie im Refraktometer unscharf war, konnte die Refraktion nur annähernd bestimmt werden.

Tabelle 20.

Hydrierungszeit Stunden:	Refraktion bei 40° Schwarze Linie
0	61
10	61
20	61
30	61—62
44	61—62
45	61—62

Nach dem Filtrieren und Erkalten der dunkelbraunen Masse (Jodzahl nach Wijs 99,1) schied sich ein Teil, ungefähr die Hälfte, in fester Form ab; da der flüssig gebliebene Anteil noch zu groß war, wurde das Ganze nunmehr bei einer Temperatur bis 175° weiter hydriert.

Vierte Hydrierung.

253 g des Rückstandes von der dritten Hydrierung wurden mit 15,2 g der Katalysatormasse, entsprechend einem Gehalt von 0,1% Palladium, bei 175° hydriert.

Tabelle 21.

Hydrierungszeit Stunden	Refraktion bei 40°
0	62,0
18	62,5
32	62,5
44	62,5
52	62,0

Nach dem Filtrieren und Erkalten des Reduktionsproduktes hatte sich der abgeschiedene feste Anteil nicht wesentlich vermehrt. Die Farbe des flüssig gebliebenen Anteils war jedoch nach dem letzten Hydrieren noch dunkler, was möglicherweise durch kolloidal gelöstes Palladium verursacht worden war. Die Jodzahl (98,0 nach Wijs) war fast dieselbe geblieben. Es wurde versucht, durch fraktionierte Kristallisation den festen vom flüssigen Anteil zu trennen, bezw. feste Glyceride zu gewinnen, um diese auf Sterinester zu untersuchen. Um die Löslichkeit der Glyceride zu vermindern, wurde der 249,6 g betragende Rückstand zunächst aus nur 125 ccm Äther und dann aus

Aceton kristallisiert. Die erhaltenen Kristallfraktionen waren von halbfester Konsistenz und ließen sich schwer filtrieren.

Die Ergebnisse waren folgende:

Tabelle 22.

Fraktion	Art. u. Menge des Lösungsmittels ccm	Kristallisations- Temp. °	Kristallisations- Dauer Std.	Auskristallisierte Glyceride Menge g	Auskristallisierte Glyceride Schmelzpunkt °	Sterinbestimmungen. (a) Gesamt-Sterine b) Freie Sterine) Sterine aus g	Sterine in mg	In der Fraktion mg	In der Fraktion mg-%	in % der Sterinmenge des Fettes
I.	125 Aether	0	3	7,2	41,0	a) 3,0	14,6	35,0	490,3	1,2
						b) 4,0	8,6	15,5	215,3	1,9
II.	200 Aceton	0	2	20,0	33,5	a) 5,0	26,74	107,0	535,0	3,6
						b) 5,0	0,97	3,9	19,5	0,5
III.	200 Aceton	0	2	33,3	31,0	a) 15,3	102,7	223,1	670,0	7,5
						b) 5,0	0,365	2,4	7,2	0,3
IV.	In der Mutterlauge			186,2	flüssig	a) 2,0	17,75	1653,5	888,0	55,3
						b) 5,0	0,73	27,9	15,0	3,4

Aus den Ergebnissen dieses Versuches ist erkennbar, daß die vollständige Hydrierung der ungesättigten Fettsäuren des Lebertranes nicht erreicht worden ist, indem 186,2 g eines Öles übrig blieben, das offenbar aus Isoölsäure-Glyceriden bestand.

Wie aus der Tabelle 18 hervorgeht, waren von den nach der ersten Hydrierung noch vorhandenen Gesamt-Sterinen in der Mutterlauge noch 86% vorhanden. Wenn nach der fraktionierten Kristallisation nach der vierten Hydrierung im ganzen nur noch 67,6% der nach der ersten Hydrierung vorhandenen Gesamt-Sterine wiedergefunden wurden, so ist dies offenbar auf die Zerstörung der Sterine durch die zweite, dritte und vierte Hydrierung zurückzuführen. Es gelang bei diesem Versuche infolge der unvollkommenen Hydrierung auch nicht, Sterinester aus dem Lebertran abzuscheiden.

4. Versuche zur Darstellung von Sterinestern aus selbstgehärtetem Rüböl.

Um auch einen pflanzlichen Sterinester darzustellen, wurde ein Rüböl (II) mit folgenden Kennzahlen in Arbeit genommen:

Tabelle 23.

Verseifungszahl	Jodzahl (n. Wijs)	Refraktion bei 40 °	Unverseifbares %	Sterine in mg-% Gesamt-Sterine	freie Sterine	als Ester	Schmelzpunkt des Sterins °
178,6	104,7	68	539	362	87	275	129,5

Die Hydrierung des Rüböls wurde in der gleichen Weise und unter denselben Bedingungen wie beim Lebertran durchgeführt. Dreimal je 250 g Rüböl wurden mit 15 g Palladiumkieselgur, entsprechend 0,1% Palladium, als Katalysator bei 140° bis 155° in einem Ölbade mit elektrolytischem Wasserstoff gehärtet.

Die folgenden Tabellen geben den Verlauf des Hydrierungsprozesses wieder:

Tabelle 24.

Erste Hydrierung:

1. Probe			2. Probe		
Härtungs-Dauer Stunden	Refraktion 40° Schwarze Linie	Blaue Linie	Härtungs-dauer Stunden	Refraktion 40° Schwarze Linie	Blaue Linie
0	68,0	59,5	0	68,0	59,5
10	56,0	55,0	5	57,8	57,0
15½	54,5	53,0	12	55,0	54,0
20½	52,5	52,0		52,5	52,2
			25½	52,5	52,2
21½	52,5	52,0	31	52,0	52,0
23½	52,5	52,0	32	52,0	51,5
26½	52,0	51,5			
32	52,0	51,5		3. Probe	
			0	68,0	59,5
			10	54,5	53,5
			22	53,0	52,5
			31	52,0	52,0

Bei der ersten Probe war nach 20½stündiger Hydrierung, bei der zweiten Probe jedoch schon nach 11 Stunden ein Festwerden des Rüböls zu erkennen.

Tabelle 25.

Kennzahlen des Rüböls vor (a) und nach (b) dem Hydrieren.

Schmelzpunkt des Fettes °	Verseifungszahl	Jodzahl (nach Wijs)	Refraktion bei 40°	Gesamt-Sterine mg-%	Gesamt-Unverseifbares %
a) flüssig	178,6	104,7	68	362	539
b) 42,8—43,5	179,0	58,0	52	369	548

Die Hydrierung hat ein starkes Sinken der Jodzahl und der Refraktion des Rüböls und dementsprechend ein Steigen des Schmelzpunktes zur Folge. Zur Darstellung der Sterinester des gehärteten Rüböls wurden 500 g in Mengen von je 100 g in 500 ccm Äther gelöst und durch fraktionierte Kristallisation aufgeteilt.

Die Ergebnisse waren folgende:

Tabelle 26.

Fraktionierte Kristallisation:

Fraktion	Art u. Menge des Lösungsmittels ccm	Kristallisations-Temp. °	Kristallisations-Dauer Std.	Glycerid-Kristalle Menge g	Glycerid-Kristalle Schmelzpunkt °	Gesamt-Sterine in 5 g der Fraktion mg	Gesamt-Sterine in der gesamt. Fraktion mg	Gesamt-Sterine in der gesamt. Fraktion mg-%	in % der Gesamt Sterine d. hydr. Fettes
I.	2500 Aether	13—20	5	78,1	56	0,43	6,7	8,6	0,4
II.	1250 Aether	0	2	207,8	46,5	6,5	270,0	130,0	14,6
III.	1250 Aether	—10	2	50,5	41,0	4,2	42,4	84,0	2,3
IV.	625 Aether	—10	2	36,8	40,2	9,2	68,1	185,0	3,7
V.	In d. Mutterlaugen v. 500 g:			121,9	34,8	49,8	1214,1	995,9	65,8
							Freie Sterine:		
						0,4	9,7	8,0	—

90,0 g der Mutterlaugenglyceride wurden unter denselben Bedingungen wie vorher weiter hydriert.

Tabelle 27.

Zweite Hydrierung:

Hydrierungszeit Stunden:	Refraktion bei 40° Schwarze Linie	Blaue Linie
0	53,9	53,0
10	Die Refraktionen konnten	
20	nicht scharf abgelesen werden	

Die nach Abfiltrieren vom Katalysator erhaltene Substanz, 90 g, wurde auf dem Wasserbade in 450 ccm Äther gelöst. Die Lösung wurde darauf unter öfterem Umrühren 3 Stunden bei Zimmertemperatur zum Kristallisieren hingestellt und die sich abscheidenden Kristalle (I) abfiltriert; ihre Menge betrug 0,98 g vom Schmelzpunkt 113,3°. Da die Kristalle in Äther zu schwer löslich waren, wurden sie in 35 ccm Benzol unter gelindem Erwärmen gelöst. Die bei Zimmertemperatur abgeschiedenen Kristalle schmolzen bei 113,4°; aus der Mutterlauge ließen sich auch nach Einengen auf die Hälfte und aus 50 ccm Äther bei Zimmertemperatur keine weiteren Abscheidungen gewinnen. Da in den Kristallen vom Schmelzpunkt 113,4° Sterine bezw. Ester des Phytosterins vermutet wurden, wurden sie zunächst getrocknet und dann mit alkoholischer Kalilauge verseift. Da die Substanz sich auch nach Zusatz von 25 ccm Benzol zur Erhöhung der Löslichkeit beim Verseifen nicht löste, wurde das Benzol abdestilliert und mit 25 ccm Xylol weiterverseift; trotz zweistündiger Verseifung blieben jedoch noch einige Kristalle ungelöst; es wurde nun ohne Rücksicht darauf der Alkaliüberschuß zurücktitriert.

Angewendete Substanz:	Verbrauch an Kaliumhydroxyd:	Verseifungszahl:
0,7820 g	0,1386 g	177,3

Diese hohe Verseifungszahl ließ nicht auf die Anwesenheit eines Sterinesters schließen. Zur Identifizierung des Körpers wurde die Seifenlösung alkalisch gemacht, das Xylol verdampft und der Rückstand mit 20 ccm Wasser in einen Scheidetrichter übergespült; nach zweimaligem Ausschütteln mit je 75 ccm Äther wurden die vereinigten Ätherlösungen mit Wasser gewaschen und der Äther abdestilliert. Die gesammelten Seifenlösungen wurden mit Salzsäure im geringen Überschuß angesäuert und ebenfalls dreimal mit 75 ccm Äther ausgeschüttelt; die vereinigten Ätherlösungen wurden mit Wasser gewaschen und der Äther abdestilliert.

Es wurden erhalten:

aus der alkalischen Ausschüttelung 0,03 g, (aus 5 ccm Alkohol umkristallisiert: Schmelzpunkt 63,5°; Rest bei 115°),
aus der sauren Ausschüttelung 0,694 g.

Die Neutralisationszahl der Substanz aus der sauren Ausschüttelung war folgende:

Angewendete Substanz:	Verbrauch an Kaliumhydroxyd:	Neutralisationszahl:
0,6770 g	0,1373 g	204,3

Die Seifenlösung wurde alkalisch gemacht, der Alkohol verjagt, im Scheidetrichter mit Salzsäure angesäuert und wieder mit Äther ausgeschüttelt. Der Verseifungsrückstand betrug 0,67 g und schmolz bei 55° und nach dem Umkristallisieren aus 10 ccm Alkohol bei 72°.

Die ätherische Mutterlauge der Kristalle I wurde unter Umrühren 2 Stunden bei 5 bis 10° gekühlt und die sich abscheidenden Kristalle abfiltriert; die Ausbeute betrug 12,8 (II) und der Schmelzpunkt der Substanz 43,4°. Der Gehalt an Gesamt-Sterinen in 5 mg dieser Kristalle betrug 9,3 = 186 mg-% = 1,3% der Gesamt-Sterine des Fettes der ersten Hydrierung.

In der Mutterlauge der Kristalle II waren noch 67,9 g Fett enthalten; die bei Zimmertemperatur fest gewordene Substanz wurde in 500 ccm Aceton unter Zusatz von 50 ccm Äther gelöst. Nach dreistündigem Stehen bei Zimmertemperatur schieden sich 0,40 g Kristalle (III) aus, die wegen ihrer Schwerlöslichkeit in Äther aus Benzol fraktioniert kristallisiert wurden; dabei wurden 3 Fraktionen von den Schmelzpunkten 94,8°, 92,6° und 90,7° erhalten.

Die Mutterlauge von III wurde mit 10 ccm Äther versetzt. Bei 5 bis 10° fielen 0,06 g Kristalle aus, die bei 86,9° und aus Benzol umkristallisiert bei 89,9° schmolzen. Da bei weiter erniedrigten Temperaturen nur Ölabscheidung erfolgte, wurde das Lösungsmittel ab-

destilliert; der Rückstand (67,0 g) wurde mit 4 g Palladiumkieselgur bis zu 165° unter derselben Versuchsanordnung wie zuvor hydriert.

Tabelle 28.

Dritte Hydrierung:

Hydrierungszeit Stunden:	Refraktion bei 40° (Schwarze Linie)
0	57
16	56
30	55,5
40	54,5
45	54,3
50	53,5

Nach 9½stündigem Hydrieren war das Öl wieder fest geworden; seine Menge betrug nach dem Abfiltrieren des Katalysators 65,5 g. Die fraktionierte Kristallisation lieferte folgende Ergebnisse:

Tabelle 29.

Fraktion	Lösungsmittel ccm	Kristallisations- Temp. °	Dauer Stunden	Ausbeute an festen Glyceriden Menge g	Schmelzpkt. °	Gesamt Sterine in der Fraktion mg	mg-%
1.	655 Aether	15—20	3	11,2	62,2	0	0
2.	655 Aether	0	3	13,0	52,8	0	0
3.	327 Aether	—10	3	12,4	41,4	21,6	174,2

Aus der Mutterlauge wurde der Äther abdestilliert; der Rückstand betrug 29,2 g. Er wurde in 250 ccm Aceton gelöst, und da sich bei Zimmertemperatur neben Kristallen Öltropfen ausschieden, wurden 25 ccm Äther zugesetzt. Die nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur ausgeschiedenen Kristalle wogen 0,53 g (IV) und schmolzen bei 90,2°. Bei ihrer fraktionierten Kristallisation aus Äther wurden 3 Fraktionen von den Schmelzpunkten 91,7°, 91,3° und 89,0° erhalten. Die Fraktionen von den Schmelzpunkten 91,7° und 91,3° wurden darauf wieder zusammengegeben und unter Zusatz von 10 ccm Benzol die Verseifungszahl bestimmt.

Angewendete Substanz:	Verbrauch an Kaliumhydroxyd:	Verseifungszahl:
0,2865 g	0,0236 g	82,4

Die Seifenlösung wurde nach Zusatz von Alkali eingedampft und mit 15 ccm Wasser in einen Scheidetrichter gespült; die alkalische Lösung wurde zweimal mit 50 ccm Äther ausgeschüttelt und die vereinigten Ätherlösungen dreimal mit Wasser gewaschen. Nach Ab-

Verbrennung des Fettes wurden 3,167 g Harn von Schwankungen 37,7° gelassen. Die mit Äther ausgeschüttelte Säurelösung wurde mit Lauge neutralisiert, darauf mit 10 ccm Äther ausgeschüttelt und die wenigstens Äthermengen mit Wasser gewaschen. Nach dem Abdestillieren des Äthers verblieben 0,1322 g Fettsäure. Deren Verseifungszahl betrug 196.

Ausgewogene Harnmenge:	Verbrauch an Kaliumhydroxyd:	Verseifungszahl:
0,1322 g	0,1271 g	193,7

Zur Bestimmung der Schmelzpunkte wurden die Fettsäuren aus der Lösung abgeschieden, sie zeigten den Schmelzpunkt 69,5° (bei auf einem kleinen Rest) und aus 5 ccm Äthanol umkristallisiert 69,7°, während der Schmelzpunkt der Myristinsäure 67,5° betrug.

Es wurden demnach aus dem bei 37,7° und 31,3° schmelzenden Fettgemisch 0,1322 g entsprechend 11,2% Harn vom Schmelzpunkt 37,7° und 0,1121 g entsprechend 44,2% Harnsäure vom Schmelzpunkt 69,5° gewonnen. Bei der geringen Substanzmenge konnte keine weitere Untersuchung ausgeführt werden.

Die gefundene prozentuale Zusammensetzung der Fettsäuren aus Pferdefett entspricht ebenfalls ziemlich der theoretisch. 11,2% Harn und 44,2% Harnsäure ergibt auf diese Fettsäure berechnet 56,1 Harn. Die gefundene Verseifungszahl von 22,4 kommt dieser Zahl nahe. Die Jodzahl konnte bei dieser (193,7) wurde zwar von der des Harnsäure (193,5) etwas ab und lag zwischen der des Harnsäure und Palmitinsäure (181,3) wurden durch den Vorliegen einer Substanz von Fettsäureester und spaltete verschiedentlich aus und die Schmelzpunkte der Laure (42,5°) durch eine Beimischung von Palmitinsäure niedrig gedrückt wurden wurde und es kommt in der Bestimmung der Harnsäuremenge und bei der zur Verfügung stehenden geringen Substanzmenge vorliegt.

Die Abscheidung von der Kapsäure (V) (siehe S.) wurde vor Verwendung weiterer Kapsäure auf 0° und −15° abgekühlt. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Tabelle 31

Versuch	Art u. Menge der Lösung	Konzentration Prozent	Dauer Std.	Abkühlung Temp.	Gefrierpunkt	Gefrierpunkt Menge	Gefrierpunkt	Harnsäure Menge
						mg	mg %	
1	250 Aqua dest.							
	25 Acetat	0	1	2,2	37,5	46,6	186,3	1
2	dest.	−10	1	3,3	31,3	46,1	184,1	1

Die Mutterlauge enthielt noch 11,7 g Substanz gelöst.

Es gelang somit, aus dem gehärteten Rüböl durch Kristallisation aus Aceton Kristallfraktionen von den Schmelzpunkten 113,3°, 91,0° und 90,2° zu gewinnen, von denen sich die bei 90,2° schmelzende Fraktion als Phytosterinstearat erwies.

II. Versuche einer Trennung der Sterine des Rüböls nach A. Windaus und A. Welsch.

1. Darstellung der Sterine des Rüböls nach A. Bömer.

Der Zweck der Darstellung der Sterine des Rüböls war zunächst eine Trennung der beiden Sterine, des Sitosterins und des Brassicasterins, durchzuführen, um dann Verbindungen des Brassicasterins darzustellen, von denen bisher nur wenige bekannt sind. Es wurde ein rohes Rüböl des Handels verwendet. Das Öl von grünbrauner Farbe hatte folgende Kennzahlen und Gehalte:

Tabelle 31.

Verseifungszahl	Jodzahl (Wijs)	Erucasäure Schmelzpunkt °	Erucasäure Jodzahl (Wijs)	Arachinsäure Schmelzpunkt °	Gesamt-Unverseifbares %	Sterine in mg-% gesamte	Sterine in mg-% freie	Sterine in mg-% in Esterform
180,5	106,9	31,5	68,0	76,0	1,03	507	208	299

A. Zur Gewinnung der Rüböl sterine wurden 2 kg des Öles nach dem Verfahren von A. Bömer[1]) ausgeschüttelt. Die Gesamtmenge des Unverseifbaren betrug 20,59 g; es war von rotbrauner Farbe. Zwecks Reinigung wurde es aus 100 ccm Alkohol umkristallisiert. Aus der noch warmen Lösung schieden sich die Sterine in schönen Kristallen und daneben Öltropfen ab. Da die Sterine in Petroläther verhältnismäßig schwer löslich sind, die Öltropfen aber, wie ein Vorversuch ergab, darin leicht löslich waren, wurde der Kristallbrei unter öfterem Durchrühren solange bei Zimmertemperatur stehen gelassen, bis der Alkohol fast vollständig verdunstet war. Darauf wurde die Kristallmasse zur Abtrennung der Öltropfen und der sonstigen nicht kristallisierten Stoffe des Unverseifbaren mit 100 ccm Petroläther in der Kälte behandelt. Darauf wurde die Petrolätherlösung auf der Nutsche abgesaugt und die Kristalle mit 25 ccm Petroläther nachgewaschen. Nach dem Trocknen hatten die Sterinkristalle eine hellgelbe Farbe und schmolzen bei 138,2°; die Menge betrug 9,26 g. Nach Abdestillieren des Petroläthers aus der Mutterlauge blieben 12,4 g einer rotbraunen, dickflüssigen Substanz

1) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm., **1**, 21 (1898).

zurück, aus der weder durch Petroläther noch Alkohol weitere Kristalle zu isolieren waren.

Die Kristalle vom Schmelzpunkt 138,2° wurden zwecks Reinigung fraktioniert gelöst. Hierbei wurden die Kristalle, das erste mal aus 50 ccm Petroläther und dann aus 75 bis 100 ccm Alkohol 2 bis 3 Stunden lang bei Zimmertemperatur kristallisiert. Die Ergebnisse der fraktionierten Lösung waren folgende:

Tabelle 32.

Fraktion	Auskristallisierte Sterine		Sterine der Mutterlauge	
	Menge g	Schmelzpunkt °	Menge g	Schmelzpunkt °
1.	8,2	138,0	1,1	—**)
2.	7,3	140,7	0,87	133,6
3.	6,6	142,2	0,62	137,6
4.	6,0	142,1	0,53	138,0
5.	5,3	142,0	0,59	138,5
6.	4,3	142,1	1,0	140,1
7.	3,6	141,5	0,65	140,0
8.	2,5	141,6	0,95	138,7
9.	1,8	141,3	0,67	139,1
10.	1,1	142,0	0,60	141,0
11.	0,45	142,6	0,63	139,0
12.	—	—	0,45	141,0

*) Der Schmelzpunkt wurde von der aus Schmelzfluß erstarrten Substanz bestimmt.

**) Die Substanz enthielt Kristalle und nicht kristallisierte Substanz. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Alkohol wurden daraus 0,31 g Sterine vom Schmelzpunkt 135,5° gewonnen.

Die gelösten Sterine der Fraktionen 1 bis 3 waren noch schwach gelblich. Sie wurden daher mit der Fraktion 4 vereinigt und nochmals in der gleichen Weise mit 50 ccm Alkohol fraktioniert gelöst. Das Ergebnis war folgendes:

Tabelle 33.

Fraktionierte Lösung der Mutterlaugenkristalle 1—4.

Fraktion	Auskristallisierte Sterine		Sterine der Mutterlauge	
	Menge g	Schmelzpunkt °	Menge g	Schmelzpunkt °
1.	1,77	139,0	0,50	—*)
2.	1,23	140,7	0,48	134,6
3.	0,70	140,6	0,47	140,0
4.	0,31	141,2	0,38	139,3
5.	—	—	0,28	140,3

*) Nach dem Umkristallisieren aus Alkohol betrug der Schmelzpunkt 134,5°.

Die vorstehenden Fraktionen 3 bis 5 und die Fraktionen 5 bis 12 der ersten fraktionierten Lösung wurden vereinigt und aus 100 ccm Alkohol nochmals bei Zimmertemperatur kristallisiert. Der Schmelzpunkt der ausgeschiedenen Kristalle (6,2 g) betrug nunmehr 141,6°; nach Einengen der Mutterlauge auf 25 ccm fielen nochmals 0,35 g Sterine vom Schmelzpunkt 140° aus. Die in der nunmehrigen Mutterlauge gelöst gebliebenen Sterine schmolzen bei 138,8°.

Die spezifische Drehung der Kristalle vom Schmelzpunkt 141,6° in Chloroformlösung betrug $(\alpha)_D = -37{,}25°$.

B. Für einen weiteren Versuch zur Trennung der Sterine des Rüböls wurden 2 Kilo des rohen Rüböls verarbeitet, das Unverseifbare in der gleichen Weise wie bei A dargestellt, und die aus Alkohol kristallisierten Sterine ebenfalls wie unter A mit 100 ccm Petroläther von den Begleitstoffen der Sterine möglichst befreit. Die so gewonenen Sterine (8,4 g) zeigten nur eine schwach gelbliche Farbe und schmolzen bei 141,5°. Durch Petroläther wurden 12,9 g Unverseifbares gelöst. Es wurde versucht, daraus durch Erhitzen mit Essigsäureanhydrid noch Sterinacetate darzustellen; es trat aber keine Ausscheidung von Sterinacetat ein.

2. Trennung der Sterine nach A. Windaus und A. Welsch.

A. Windaus und A. Welsch[2]) haben im Rüböl 2 Sterine nachgewiesen; ein Sitosterin ($C_{27}H_{46}O+H_2O$) vom Schmelzpunkt 142,0° und ein Brassicasterin ($C_{28}H_{46}O+H_2O$). Sie haben diese beiden Sterine getrennt mit Hilfe der Acetatbromide, von denen das Acetattetrabromid (Brassicasterin-Komponente) in Äther-Eisessig unlöslich ist, während das Acetatdibromid (Sitosterin-Komponente) darin löslich ist. Dieses Verfahren wurde bereits vorher von A. Windaus und A. Hauth[3]) zur Trennung der Sterine Sitosterin und Stigmasterin des Calabarbohnenfettes angewendet.

A. Es wurde versucht, nach dem Verfahren von A. Windaus und A. Welsch die im vorhergehenden Abschnitte aus Rüböl dargestellten Sterine vom Schmelzpunkt 141,6° zu trennen. Zu diesem Zwecke wurde wie folgt verfahren: 6,1 g Sterine wurden mit 61 ccm Essigsäureanhydrid 2 Stunden acetyliert. Die Ausbeute betrug 6,79 g. Die Acetate wurden in 100 ccm Äther gelöst und 125 ccm Brom-Eisessig hinzugefügt; hierbei soll sich das Tetraacetat des Brassicasterins unlöslich ausscheiden. Bei diesem Versuch setzte erst nach 24 Stunden eine geringe Kristallbildung ein, die sich während des Absaugens der Kristalle in Folge Verdunstens von Äther noch vergrößerte. Diese Kristalle schmolzen bei 115,0°, während sich das Tetraacetat des Brassicasterins bei 209° unter Braunfärbung zersetzte. Die Ausscheidung vom Schmelzpunkt 115,0° wurde darauf

2) Ber. d. dtsch. chem. Ges., **40**, 3681 (1907) u. **42**, 612 (1909).
3) Ber. d. dtsch. chem. Ges., **39**, 4378 (1906).

wieder mit der Mutterlauge vereinigt. Nach Zusatz von Natrium-amalgam zur Entfernung des überschüssigen Broms und Abfiltrieren des Qecksilbers wurde der Äther abdestilliert, der Rückstand weiter mit Zinkstaub und Eisessig 3 Stunden am Rückflußkühler erhitzt, heiß filtriert, nach Zusatz von Wasser und Erkalten die sich abscheidenden Kristalle gesammelt. Die Ausbeute betrug rund 5 g. Da die Substanz in 75 ccm Alkohol schwer löslich war, wurden 10 ccm Chloroform hinzugefügt. Nachdem alles gelöst war, wurden nach einiger Zeit bei Zimmertemperatur Kristalle in Ausbeute von 3,12 g vom Schmelzpunkt 136,4° bis 136,6° gewonnen; die Mutterlaugenkristalle (0,41 g) schmolzen bei 126,5°. Das nach Zusatz von Wasser erhaltene essigsaure Filtrat wurde mit Äther ausgeschüttelt, und die erhaltenen Kristalle mit den zuletzt gewonnenen zwecks nochmaliger Bromierung vereinigt. 5,88 g des so wiedergewonnenen Sterinacetats wurden in der zehnfachen Menge Äther gelöst. Nach Zusatz von 73,8 ccm Brom-Eisessig wurden nach 48 Stunden die abgeschiedenen Kristalle abfiltriert. Beim viermaligen Umkristallisieren aus Chloroform-Alkohol wurden folgende Schmelzpunkte gefunden: 150,0°, 170,0°, 172,5°, 179,0° und 180,0°. Die Ausbeute an Kristallen war aber nur gering; sie hatten seidenglänzendes Aussehen. Der von A. Windaus und A. Welsch für Brassicasterinacetat-tetrabromid gefundene höhere Schmelzpunkt 209° wurde nicht erreicht.

Das Äther-Brom-Eisessig enthaltende Filtrat mit der noch gelöst gebliebenen Sitosterinacetatdibromid-Komponente wurde mit Natriumamalgam entbromt, der Äther abdestilliert, mit Zinkstaub und Eisessig während vierstündigem Erhitzen die letzten Bromreste entfernt, heiß filtriert und nach Zusatz von Wasser und Erkalten der Lösung die Sterinacetate abfiltriert. Zur Reingewinnung des Sterins wurde das Acetat 4 Stunden mit alkoholischer 10%iger Kalilauge verseift und nach vorsichtigem Wasserzusatz das Sterin gewonnen; nach zweimaligem Umkristallisieren aus Alkohol schmolz die Substanz bei 136,5°, dem Schmelzpunkt des Sitosterins.

Die vorstehenden Untersuchungen zur Trennung und Darstellung der Sterine des Rüböls hat demnach ergeben, daß aus dem Rüböle ein Acetattretrabromid vom Schmelzpunkt 209°, wie A. Windaus und A. Welsch es für die Brassicasterin-Komponente gefunden haben, nicht gewonnen werden konnte; vielmehr betrug der höchste Schmelzpunkt des gewonnenen Acetattetrabromids aus dem Rüböl 180°.

B. Die nach 1. B. gewonnenen 8,4 g Sterinkristalle vom Schmelzpunkt 141,5 g wurden durch dreistündiges Erhitzen mit 85 ccm Essigsäureanhydrid acetyliert. Nach dem Erkalten der Lösung schied sich das Acetat in glänzenden Kristallen ab; die Ausbeute an Sterinacetat betrug 8,6 g vom Schmelzpunkt 128°. Die Acetate wurden darauf in 86,5 ccm Äther gelöst und 108, 1 ccm Brom-Eisessig hinzugefügt; bereits nach wenigen Minuten setzte Kristallbildung ein; die Ausbeute betrug nach vierstündigem Stehen 3,6 g vom Schmelzpunkt 125°. Aus der Mutterlauge schieden sich nach einiger Zeit wiederum Kristalle

aus, die bei 115° schmolzen; aber auf weiteren Zusatz sich wieder lösten bis auf einen Rest, der bei 160° schmolz. Die bei 125° schmelzenden Acetatbromide wurden zwecks Trennung der Sterinacetatbromide mittels 20 ccm eines Gemisches aus gleichen Teilen Chloroform und Alkohol fraktioniert gelöst, und auf diese Weise 0,18 g schwerlösliche Acetatbromide vom Schmelzpunkt 180° und größere Mengen (über 2 g) leichter lösliche Acetatbromide vom Schmelzpunkt 116,5 bis 119,0° gewonnen.

Die schwerlöslichen Acetatbromide vom Schmelzpunkt 180° kristallisierten in großen Tafeln von phytosterinähnlicher Form, während die Acetatbromide vom Schmelzpunkt 116,5° bis 119,0° undeutliche kristallisierte Drusen bildeten.

Zwecks Darstellung der Sterine aus den beiden Acetatbromiden wurden letztere nach Vereinigung mit den unter A. gewonnenen Acetatbromiden vom Schmelzpunkt 180°, zusammen 0,33 g, zunächst zur Entbromung mit 0,35 g Zinkstaub und 50 ccm Eisessig 3 Stunden gekocht, heiß filtriert und aus der Lösung nach Wasserzusatz und Erkaltenlassen die abgeschiedenen entbromten Acetate abfiltriert. Nach wiederholtem Umkristallisieren schmolzen sie bei 154,8°; Windaus und Welsch fanden für Brassicasterinacetat den Schmelzpunkt 157 bis 158°. Durch Verseifen des gereinigten Acetats (0,1 g) mit alkoholischer 50%iger Kalilauge und Ausfällung mit Wasser wurde ein Sterin gewonnen, das nach dem Umkristallisieren aus 10 ccm Alkohol bei 148° schmolz und mit dem von Windaus und Welsch nach dem gleichen Verfahren dargestellten Brassicasterin im Schmelzpunkte übereinstimmte.

Aus den Acetatbromiden vom Schmelzpunkt 116,5° bis 119° wurde in gleicher Weise mit Zinkstaub und Eisessig ein Acetat gewonnen, das bei 136,5° schmolz und nach dem Verseifen ein Sterin vom Schmelzpunkt 141,9° lieferte; seine Menge betrug 0,65 g. Die Kristallform war die gleiche, wie sie A. Bömer für Phytosterine angegeben hat.

Da nur geringe Mengen des Brassicasterins aus den ausgefallenen Acetatbromiden vom Schmelzpunkt 125° (s. oben) zu gewinnen waren, wurde zwecks Gewinnung des Sterins aus der Ätherbrom-Eisessiglösung diese mit 86 g Natriumamalgam reduziert, filtriert, der Äther abdestilliert und der Rückstand mit 4,5 g Zinkstaub am Rückflußkühler 2 Stunden erhitzt; da die Lösung noch durch Brom schwach gefärbt war, wurden weitere 4,5 g Zinkstaub hinzugefügt und bis zur Entfärbung gekocht. Nachdem das Ganze heiß filtriert war und 30 ccm Wasser zugesetzt waren, wurde die Ausscheidung nach längerem Stehen abfiltriert und das Sterinacetat mit alkoholischer 10%iger Kalilauge 4 Stunden verseift. Die Lösung wurde mit Wasser verdünnt, das Sterin abfiltriert und das Filtrat mit Äther ausgeschüttelt. Nach Vereinigung der Sterinkristalle wurden sie mehrmals aus Alkohol umkristallisiert und schmolzen nunmehr bei 139,6°.

Zur näheren Kennzeichnung der im Vorstehenden gewonnenen Sterine von den Schmelzpunkten a) 141,9° (s. oben) und b) 139,6° (vor-

stehend) wurden sie zunächst polarisiert, dann die Sterinacetate dargestellt, diese fraktioniert kristallisiert und zuletzt wieder in die Sterine übergeführt. Die Polarisation wurde bei a) in einer Lösung von 0,5 g, bei b) in einer solchen von 1,0 g auf 25 ccm Chloroform ausgeführt. Die Polarisation betrug bei a) — 1,5° und bei b) — 2,7°. Die Ergebnisse waren folgende:

Tabelle 34.

	Sterin b vom Schmelzpunkt 141,9°	Sterin b vom Schmelzpunkt 139,6°
Spezifische Drehung $(\alpha)_D$:	— 37,5°	— 33,4°
Schmelzpunkt des Acetates	132,6°	131,8°
desgl. nach dem Umkristallisieren	134,6°	133,0°
Schmelzpunkt des Alkoholes selbst	140,6°	141,2°

Hieraus geht hervor, daß die Sterine a und b identisch waren. Es handelt sich bei beiden um Sitosterin. Windaus und Welsch haben das Sitosterin des Rüböls nicht näher untersucht. Dies ist geschehen von Schmid und Waschkau[4]). Sie kamen unter anderem zu dem Ergebnis, daß die Ähnlichkeit des Brassicasterins aus Rüböl mit dem Stigmasterin aus Calabarbohnenfett nicht nur in dem Löslichkeitsverhältnis bestehe, sondern auch in kristallographischer und optischer Hinsicht sehr weitgehend vorhanden sei, obwohl der Schmelzpunktsunterschied von 170,0° für Stigmasterin und 148,0° für Brassicasterin beträchtlich ist. Da genannte Autoren auch bei der wiederholten Bromierung und Entbromung des Sitosterinacetats aus Rüböl den Schmelzpunkt 132,0° bis 133,0° fanden, während dasselbe Acetat aus Calabarbohnenfett bei 127,0° bis 128,° schmelzen soll, so versuchten sie, das Sitosterin über das Digitonid zu reinigen und gelangten daraufhin zum gleichen Schmelzpunkt 127,0° bis 128,0°. Nach Verseifen des Acetats vom Schmelzpunkt 132,0° bis 133,0° erhielten sie ein Sterin, das bei 139,5° bis 140,0° schmolz (nach A. Windaus 142,0°), und nach Fällen mit Digitonin und Zerlegen mit Xylol im Stockschen Apparat den Schmelzpunkt 136° bis 137° zeigte; das Acetat schmolz bei 127,0° bis 128,0° und war gleich dem aus Calabarbohnenfett gewonnenen Sitosterinacetat. Das Benzoat schmolz wie bei A. Windaus bei 143,0°.

Der Unterschied des über das Digitonid gereinigten Sitosterins mit dem zuerst erhaltenen beträgt bei Schmid und Waschkau etwa 3° und für das entsprechende Acetat 8,5°. Trotzdem schließen Schmid und Waschkau ihre Abhandlung mit den Worten: „Somit glauben wir mit großer Wahrscheinlichkeit sagen zu dürfen,

4) Monatshefte für Chemie, **48**, 139/44.

LEBENSLAUF

Am 15. September 1898 wurde ich in Poelloe-Tello (Sumatra) geboren. Vom Jahre 1905—1909 besuchte ich zunächst die Bürgerschule und alsdann das Humanistische Gymnasium zu Gütersloh i. Westf. Während des Weltkrieges trat ich im Jahre 1916 mit Primareife in das deutsche Heer ein. Ich kämpfte bis zum Frühjahr 1918 an der Westfront mit (Laôn, Chavignon, Richecourt, Flirey und Amiens). Im Mai 1918 wurde ich als Flugzeugführer bei der Fea 1 u. 5 ausgebildet. Vom Februar 1919 an nahm ich an dem Sonderkursus für Kriegsteilnehmer meines Gymnasiums in Gütersloh teil und bestand am 10. Juli 1919 die Reifeprüfung. Darauf wandte ich mich zunächst der Apothekerlaufbahn zu, absolvierte in Minden in Westfalen das Vorexamen und im Jahre 1924 in Branschweig das Staatsexamen. Anschließend studierte ich in Hamburg Naturwissenschaften und bestand im Jahre 1926 an der dortigen Universität das Staatsexamen für Nahrungsmittelchemiker. Nach einjährigem Aufenthalt an der Landwirtschaftlichen Versuchsstation zu Rostock i. M. und der dortigen Universität unterbrach ich meine Studien, um vorerst die Approbation als Apotheker zu erhalten, die mir im September 1928 vom Braunschweigischen Staatsministerium zuerteilt wurde. Im Oktober 1928 wurde ich von Herrn Prof. Dr. A. Bömer, Münster i. Westf., Landwirtschaftliche Versuchsstation, als Doktorand angenommen und fertigte daselbst meine Arbeit über „Beiträge zur Kenntnis der Sterine“ an. Sie wurde im Dezember 1930 beendet.

Werner Frickenschmidt.